Određivanje koncentracije DNA u humanim i biljnim uzorcima

Štajnbrikner, Marija

Master's thesis / Diplomski rad

2017

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **Josip Juraj Strossmayer University of Osijek, Department of Chemistry / Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Odjel za kemiju**

Permanent link / Trajna poveznica: https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:182:356010

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

Download date / Datum preuzimanja: **2024-03-29**

Repository / Repozitorij:

Repository of the Department of Chemistry, Osijek







Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku

Odjel za kemiju

Diplomski sveučilišni studij kemije

Marija Štajnbrikner

Određivanje koncentracije DNA u humanim i biljnim uzorcima

Diplomski rad

Mentor: doc.dr.sc. Katarina Mišković-Špoljarić

Neposredni voditelj: Jelena Brdarić, mag.educ.chem.

Osijek, 2017. godina

Prije svega se želim zahvaliti svojoj mentorici doc. dr. sc. Katarini Mišković-Špoljarić i asistentici Jeleni Brdarić na pomoći i savjetima pri izradi ovog diplomskog rada.

Hvala puno i mojim kolegama i prijateljima, a najviše Vedrani Sesar, Jeleni Bijelić, Antoniji Đurin, Tatjani Šafarik, Mariji Škobić, Ireni Kuliš i Tihani Njegovec koje su uvijek bile uz mene. Zajedno su nam lakše i ljepše prošli studentski dani.

Hvala mojoj obitelji i rodbini, a najveće hvala mojim roditeljima i bratu Mateju na neizmjernoj podršci, razumijevanju i odricanjima tijekom mog školovanja.

Na kraju, hvala mom dečku Dini na velikoj potpori i strpljenju.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA **Diplomski rad**

Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku

Odjel za kemiju

Diplomski sveučilišni studij kemije

Znanstveno područje: Prirodne znanosti

Znanstveno polje: Kemija

ODREĐIVANJE KONCENTRACIJE DNA U HUMANIM I BILJNIM UZORCIMA

Marija Štajnbrikner

Rad je izrađen na: Odjelu za kemiju

Mentor: doc.dr.sc. Katarina Mišković- Špoljarić

Neposredni voditelj: Jelena Brdarić, mag.educ.chem.

Sažetak:

U ovome radu određena je koncentracija DNA u biljnom uzorku odnosno bosiljku (lat.*Ocimumbasilicum*) i HeLa stanicama pomoću UV-VIS spektrofotometra i Nanofotometra. Izolirana DNA je vizualizirana primjenom elektroforeze na agaroznom gelu.

Utvrđeno je da je Nanofotometar prikladniji uređaj za određivanje koncentracije DNA, a bolje rezultate pokazuje uzorak HeLa stanica, jer je teže izolirati DNA iz biljke. Također, proces izolacije je dug što produljuje cjelokupan postupak određivanja koncentracije DNA.

Opisan je i metodički dio na temu „Nukleinske kiseline“ za srednju školu, koji sadrži pisanu pripremu za nastavni sat, radni listić, te jedan pokus. Nakon što učenici samostalnim izvođenjem predviđenog pokusa u 3 skupine dođu do određenih zaključaka, predviđeno je frontalno predavanje kao zaključak na izvedene pokuse.

Diplomski rad obuhvaća: 60 stranica, 19 slika, 2 tablice, 28 literaturnih navoda

Jezik izvornika: hrvatski

Ključne riječi: deoksiribonukleinska kiselina, svježi bosiljak (lat. *Ocimum basilicum*), HeLa stanice, UV-VIS spektrofotometar, Nanofotometar, agarozna gel elektroforeza

Rad prihvaćen:

Stručno povjerenstvo za ocjenu:

1. doc. dr. sc. DajanaGašo-Sokač
2. doc. dr. sc. Katarina Mišković-Špoljarić
3. doc. dr. sc. Elvira Kovač-Andrić

Rad je pohranjen u knjižnici Odjela za kemiju, Ulica Franje Kuhača 20, 31000 Osijek

BASIC DOCUMENTATION CARD **Graduation Thesis**

Josip Juraj Strossmayer University of Osijek
Department of Chemistry
Graduate Study of Chemistry

Scientific Area: Natural Sciences
Scientific Field: Chemistry

DETERMINATION OF DNA CONCENTRATION FROM SAMPLES OF HUMAN AND PLANTAL ORIGIN

Marija Štajnbrikner

Thesis completed at: Department of Chemistry

Supervisor: doc. dr. sc. Katarina Mišković-Špoljarić

Principal investigator: Jelena Brdarić, mag.educ.chem.

Abstract

In this thesis, concentration of DNA in the basil plant sample (*lat. Ocimum basilicum*) and HeLa cells was determined by UV-VIS spectrophotometer and Nanophotometer. Isolated DNA was visualized using agarose gel electrophoresis.

Obtained results have revealed that Nanophotometer is more suitable device for determining DNA concentration. HeLa cells sample shows better results because DNA from plants are harder to isolate. Also, the process of isolation is long which elongates the whole procedure of determining DNA concentration.

This thesis also contains a part with teaching methods on highschool level including printed preparation for lesson on „Nucleic acids“, corresponding working papersand one experiment for group work. After students divided into 3 groups experimentally come to certain conclusions, there is a lecture predicted as a conclusion on experiments.

Thesis includes: 60 pages, 19 figures, 2 tables, 28 references

Original in: Croatian

Keywords: deoxyribonucleic acid, basil (lat. *Ocimum basilicum*), HeLa cells, UV-VIS spectrophotometer, Nanophotometer, agarose gel electrophoresis

Thesis accepted:

Reviewers:

1. Dajana Gašo-Sokač, Ph.D. Assistant Professor
2. Katarina Mišković-Špoljarić, Ph.D. Assistant Professor
3. Elvira Kovač-Andrić, Ph.D. Assistant Professor

Thesis deposited in Department of Chemistry library, Ulica Franje Kuhača 20, 31000 Osijek

SADRŽAJ

1. UVOD 7
2. LITERATURNI PREGLED 9
2.1. Otkriće DNA 10
2.2. Građa molekule DNA 11
2.3. Metode DNA analize 14
2.3.1. Lančana reakcija polimerazom, PCR (engl. Polymerase Chain Reaction) 14
2.3.2. Gel elektroforeza 15
2.3.3. DNA sekvenciranje 17
2.4. Cilj istraživanja 18
3. MATERIJALI I METODE 19
3.1. Materijali 20
3.1.1. Ispitivani materijal 20
3.1.2. Kemikalije i reagensi 22
3.1.3. Instrumenti i pribor 23
3.2. Metode 24
3.2.1. Izolacija genomske DNA iz stanice u kulturi metodom isoljavanja 24
3.2.2. Izolacija genomske DNA iz biljnog tkiva 25
3.2.3. Agarozna gel elektroforeza 26
3.2.4. Određivanje koncentracije DNA pomoću Nanofotometra 27
3.2.5. Određivanje koncentracije DNA pomoću UV-VIS spektrofotometra 29
4. REZULTATI 30
4.1. Određivanje koncentracije DNA pomoću Nanofotometra 31
4.2. Određivanje koncentracije DNA pomoću UV-VIS spektrofotometra 32
4.3. Agarozna gel elektroforeza 39
5. RASPRAVA 40

6. ZAKLJUČAK....43
7. METODIČKI DIO....45
7.1. Uvod....46
7.2. Priprema za nastavni sat....47
7.3. Pokus: Izolacija genomske DNA iz biljnog materijala metodom „uradi sam“....52
7.4. Primjer radnog listića – Nukleinske kiseline....55
7.5. Primjer radnog listića – Nukleinske kiseline - rješenja....56
KRATICE....57
LITERATURA....58
ŽIVOTOPIS....60

1. UVOD

Deoksiribonukleinska kiselina – DNA (engl. *Deoxyribonucleic acid* - DNA) kompleksna je molekula koja sadrži nasljednu informaciju, koja je potrebna za razvoj i funkcioniranje svih živućih organizama. DNA se prenosi od roditeljskih organizama do njihovih potomaka tijekom procesa reprodukcije. Njena glavna uloga je pohrana genetičke informacije, a dijelovi DNA koji nose nasljednu uputu (informaciju) nazivaju se geni. U eukariotskim organizmima kao što su biljke, životinje, gljive i protisti, većina DNA je smještena u staničnoj jezgri. U jednostavnijim organizmima zvanim prokarioti, DNA nije odvojena od citoplazme jezgrinom ovojnicom. „Model dvostruke uzvojnice“ je opisan 1953. godine, a istraživači koji su zaslužni za to su James D. Watson i Francis Crick. Njihov rad je ovisio o istraživanju brojnih znanstvenika, uključujući Mieschera, Levena i Chargaffa [1].

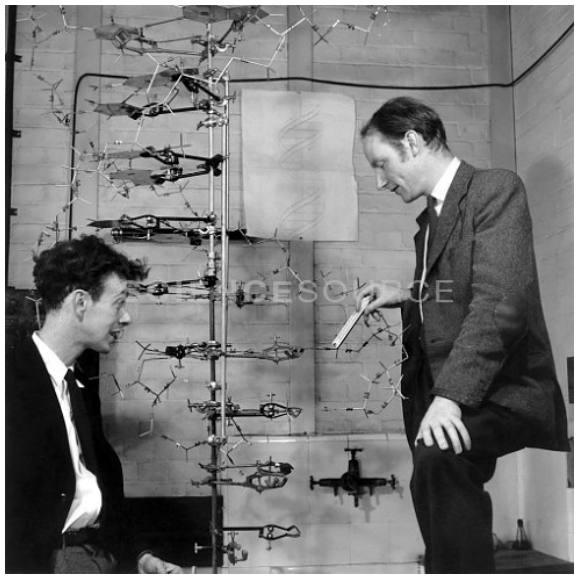
Cilj ovog diplomskog rada je ispitati osjetljivost određivanja koncentracije DNA primjenom klasičnog UV/VIS spektrofotometra i Nanofotometra te odrediti koji je uređaj prilagođeniji za koju vrstu uzorka i količinu početnog materijala. Usporedbe radi analizirana su dva uzorka: svježi bosiljak (lat. *Ocimum basilicum*) i humani uzorak HeLa stanice u dvije koncentracije ($1,5x10^6$ st/mL i $2x10^6$st/mL). Izolirana DNA vizualizirana je primjenom elektroforeze na agaroznom gelu.

2. LITERATURNI PREGLED

2.1. Otkriće DNA

Godina koja je bila značajna u genetskom istraživanju je 1869.-ta. Te godine je švicarski kemičar Friedrisch Miescher prvi identificirao „nuklein“ unutar jezgri ljudskih bijelih krvnih zrnaca. Kasnije je termin „nuklein“ promijenjen u „nukleinsku kiselinu“ te na kraju u „deoksiribonukleinsku kiselinu“. Nakon Miescherovog otkrića, znanstvenici su nastavili s istraživanjem kemijske prirode molekule poznate kao nuklein. Jedan od znanstvenika je bio Phoebus Levene, ruski biokemičar. Levene je napisao puno radova o kemiji bioloških molekula te je 1919. godine dao prijedlog da se nukleinske kiseline sastoje od niza nukleotida, te se svaki nukleotid sastoji od jedne od četiriju baza dušika, molekule šećera i fosfatne skupine. S vremenom se otkrilo da su nukleotidi uvijek povezani u istom redu, da se DNA sastoji od niza nukleotida te se svaki sastoji od tri komponente: fosfatne skupine, šećera deoksiriboze i jedne baze koja sadrži dušik. Osim toga, odredile su se i osnovne kategorije dušičnih baza, a to su purini i pirimidini te se prihvatilo da DNA sadrži adenin (A), gvanin (G), citozin (C) i timin (T) [1].

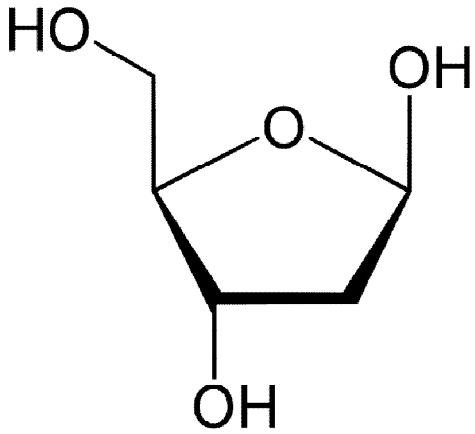
Erwin Chargaff je proširio Leveneov rad otkrivajući detalje strukture DNA te je time otvorio put Watsonu i Cricku. Chargaff je postavio svoje pravilo, da je ukupna količina purina (A+G) i ukupna količina pirimidina (C+T) gotovo jednaka. Otkriće Watsonovog i Crickovog prvog pravilnog modela strukture DNA („model dvostruke uzvojnice“) je bilo 1953. godine (slika 1). Njegovom otkriću su doprinijeli Chargaffovo pravilo i radovi koje su napisali Rosalind Franklin i Maurice Wilkins. Wilkins i Franklin su metodom rentgenske kristalografije snimali pojedinačne molekule DNA. Nakon otkrića pravilnog modela strukture, uvodile su se još neke promjene, ali su do danas ostala četiri glavna obilježja modela: 1) spiralni polinukleotidni lanci zamotani su oko zajedničke osi i teku u suprotnim smjerovima, 2) šećerno-fosfatne okosnice nalaze se na vanjskoj strani uzvojnice, a purinske i pirimidinske baze u unutrašnjosti, 3) baze su gotovo okomite na os uzvojnice, a međusobno su razmaknute 3,4Å te se struktura ponavlja svaka 34 Å pa se u svakom okretu nalazi 10 parova baza i postoji rotacija od 36° po parovima, 4) promjer uzvojnice je 20 Å [1].



Slika 1. Watson i Crick i njihov model dvostruke uzvojnice [2]

2.2. Građa molekule DNA

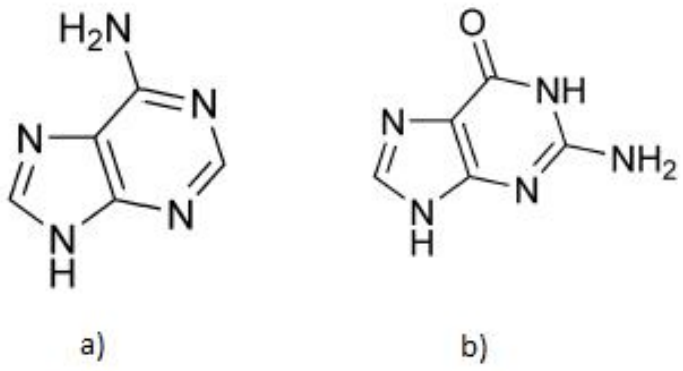
DNA je građena od serija malih molekula koje se nazivaju nukleotidi. Svaki nukleotid je građen od tri primarne komponente: dušikove baze, šećera deoksiriboze (slika 2) i fosfatne grupe vezane na molekulu šećera [3].



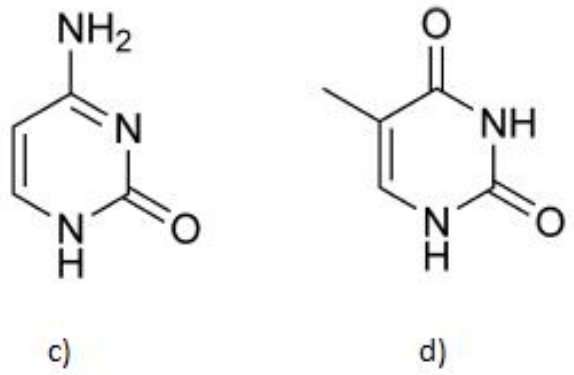
Slika 2. Šećer deoksiriboza

Preuzeto i prilagođeno iz [3]

Razlikujemo 4 različita DNA nukleotida i svaki je definiran specifičnom dušikovom bazom: adenin i gvanin (slika 3) te citozin i timin (slika 4) [3].

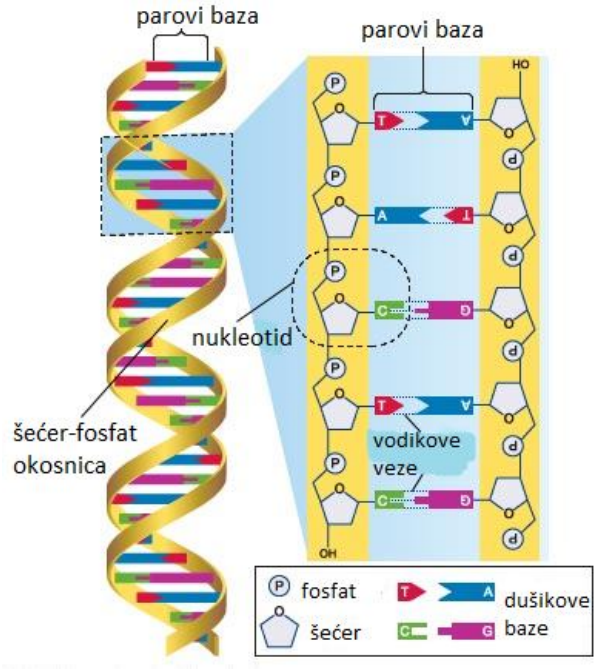


Slika 3. Purinske baze (adenin (a) i gvanin (b)) [4]



Slika 4. Pirimidinske baze (citozin (c) i timin (d)) [4]

Nukleinske kiseline nose informaciju u obliku koji se prenosi s jedne generacije na drugu te se sastoje od velikog broja povezanih nukleotida. Nukleotid je zapravo nukleozid povezan esterskom vezom s jednom ili više fosfatnih skupina. Nukleozidne jedinice u DNA su deoksiadenozin, deoksigvanozin, deoksicitidin i timidin, a one se definiraju kao jedinice koje se sastoje od baze vezane na šećer. Redoslijed baza duž lanca nukleinske kiseline nosi genetičku informaciju, a šećeri povezani fosfatima čine okosnicu koja ima strukturnu ulogu [5].



Slika 5. DNA i njeni glavni dijelovi

Preuzeto i prilagođeno iz [6]

Okosnica nukleinske kiseline (slika 5) se sastoji od niza šećera povezanih fosfodiesterskim mostovima u smjeru 3'-5'. Fosfodiesterski mostovi 3'-5' znače da je 3'-hidroksilna skupina šećera u jednom nukleotidu esterificirana fosfatnom skupinom, koja je vezana na 5'-hidroksilnu skupinu susjednog šećera. Negativni naboj fosfodiesterskog mosta odbija nukleofilne reagense (hidroksidni ion) te su zbog toga fosfodiesterske veze manje osjetljive na hidrolizu od ostalih estera. Da bi se održala cjelovitost informacije pohranjene u nukleinskim kiselinama, bitna je otpornost koju u DNA dodatno povećava odsutnost 2'-hidroksilne skupine. Sve to zajedno doprinosi stabilnosti DNA molekule i stoga je DNA, a ne ribonukleinska kiselina – RNA (engl. *Ribonucleic acid* - RNA), nositeljica genetičke informacije u svim današnjim stanicama i mnogim virusima. Okosnica je nepromjenjiva duž nukleinske kiseline, a baze se mijenjaju od jednog do drugog monomera. U kovalentnoj strukturi DNA i RNA postoje dvije razlike, kod RNA je umjesto deoksiriboze šećer riboza, a što se tiče glavnih baza, javlja se uracil umjesto timina [5].

2.3. Metode DNA analize

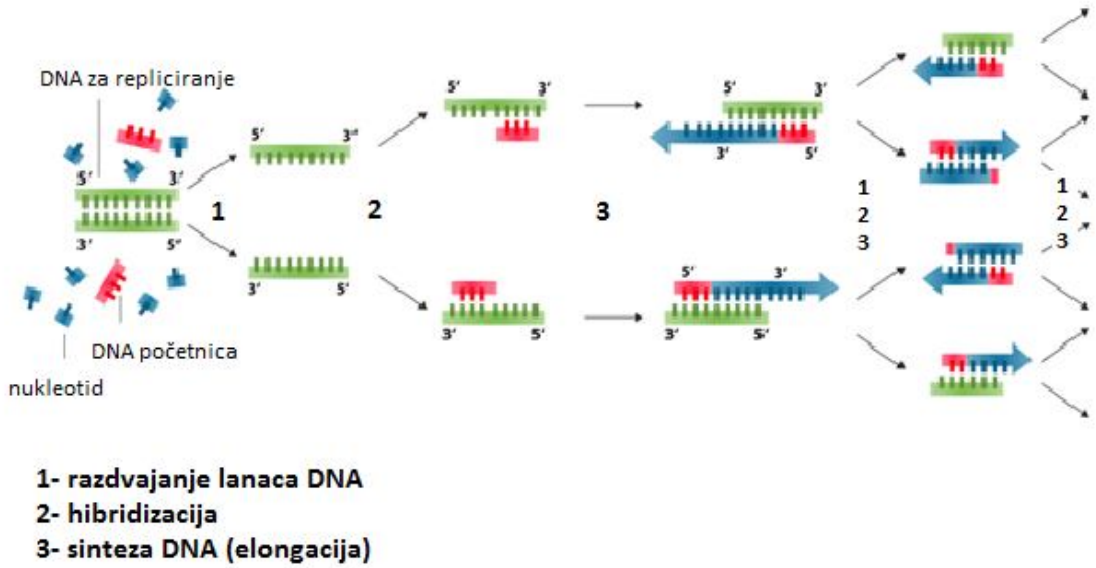
2.3.1. Lančana reakcija polimerazom, PCR (engl. Polymerase Chain Reaction)

Lančana reakcija polimerazom, PCR, je uobičajena laboratorijska tehnika koja se koristi za umnožavanje specifičnih odsječaka DNA (slika 6). Cilj PCR-a je umnožiti dovoljno ciljanih DNA odsječaka da se može analizirati. Godine 1983. Kary Mullius je otkrio i opisao metodu kojom se *in vitro* umnožava DNA bez kloniranja i to iz malih količina DNA. Za to otkriće je 1993. godine dobio Nobelovu nagradu za kemiju. Ova metoda je izvršila presudni utjecaj na primjenu molekularno-bioloških metoda u znanstvenim istraživanjima, a osobito u novom području molekularne dijagnostike, gdje su prepoznate prednosti metode u razvoju dijagnostičkih testova u mikrobiologiji, virusologiji, dijagnostici nasljednih bolesti, izboru usmjerenih „pametnih“ lijekova, u praćenju terapija i odgovora na terapiju. Također se koristi i u laboratorijima forenzike što je osobito korisno, jer je potrebna mala količina izvornog DNA. PCR metoda je brza, jeftina i jednostavna i zbog toga je jedna od najčešće korištenih metoda analize [7].

PCR je lančana reakcija u kojoj se jedan dio molekule koristi za umnožavanje i dobivanje dvije kopije, zatim četiri pa osam i tako dalje. Kontinuirano udvostručenje postiže se primjenom specifičnih proteina koji se nazivaju polimeraze. U PCR-u se primjenjuje DNA polimeraza koja je poznata kao Taq polimeraza. Ona je toplinski stabilna što je preduvjet za provođenje PCR-a koji uključuje primjenu visoke temperature za denaturiranje DNA (razdvajanje njezinih niti). Da bi obavile svoju funkciju odnosno umnožile DNA, polimeraze zahtijevaju početnicu i DNA građevne blokove (nukleotide), koji se sastoje od adenina (A), gvanina (G), citozina (C) i timina (T). PCR početnice su kratki dijelovi jednolančane DNA te su dizajnirane tako da okružuju područje koje treba kopirati [8].

Osnovni koraci PCR analize su: razdvajanje lanaca roditeljske molekule DNA (denaturacija), hibridizacija (sljepljivanje) i sinteza DNA (elongacija). U prvom koraku se DNA denaturira pri visokim temperaturama (95 °C). U drugom koraku dolazi do sljepljivanja početnica (cca 56 °C). U zadnjem koraku PCR analize, odnosno sintezi DNA, novi lanci DNA u slijedećem ciklusu predstavljaju kalup za vezanje početnica i sintezu DNA. Broj DNA molekula u svakom se ciklusu udvostruči, a optimalna temperatura Taq

DNA polimeraze pri kojoj se odvija elongacija je 72 °C. Rezultati PCR reakcije se vizualiziraju pomoću gel elektroforeze [8].



Slika 6. Lančana reakcija polimerazom

Preuzeto i prilagođeno iz [9]

2.3.2. Gel elektroforeza

Gel elektroforeza je tehnika koja se koristi za odvajanje makromolekula poput DNA, RNA i proteina na temelju veličine i naboja. Ova tehnika uključuje prolazak struje kroz gel koji sadrži molekule od interesa. Na temelju veličine i naboja, molekule će putovati kroz gel u različitim smjerovima ili različitim brzinama tako da budu odvojene jedna od druge. Gel elektroforeza dijeli DNA samo prema veličini, budući da sve DNA molekule imaju istu količinu naboja po masi. Postoje dvije vrste gela koji se koriste: agarozni i poliakrilamidni [12].

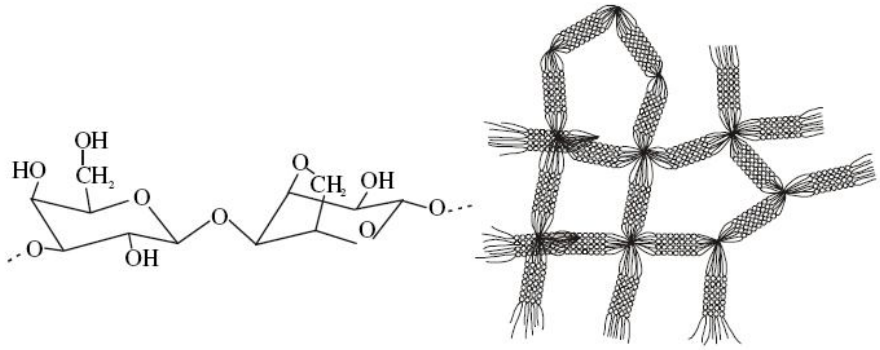
Najjednostavnija je horizontalna agarozna gel elektroforeza koja se primijenila u ovom diplomskom radu, a služi za provjeru kvalitete izoliranih nukleinskih kiselina. Ovaj način elektroforeze je najlakši i najpopularniji način odvajanja i analize DNA, te ne zahtijeva skupe kemikalije. Elektroforeza se provodi zbog električnog otpora gela tijekom provođenja električnog napona pri čemu se uspostavlja gradijent jakosti električnog polja koji ovisi o debljini gela. Zbog uspostavljenog gradijenta jakosti električnog polja,

molekule DNA prolaze kroz gel prema pozitivnoj elektrodi (katodi), zbog prisutnog negativnog naboja molekula. Linearne molekule koje su kraće i lakše, putuju brže od duljih molekula kroz pore gela [13].

Detekcija se radi primjenom fluorescentnih interkalatorskih boja kao što je SYBR safe koji je zamijenio etidijev bromid, budući da je vrlo opasna tvar te je mutagen i kancerogen. DNA vrpce se mogu vidjeti pod UV svjetlom te se dobiveni rezultati mogu detektirati. Kako bi mogli analizirati dobivene rezultate elektroforeze u agaroznom gelu, koriste se DNA standardi koji se najčešće nanose u prvu i zadnju jažicu u gelu. DNA standardi su specifični, točno određene veličine DNA segmenti koji se koriste za određivanje veličine dobivenih nepoznatih i poznatih uzoraka [10].

SYBR safe povećava osjetljivost smanjenjem nespecifične pozadinske fluorescencije i manje je štetan. On se sigurno veže za DNA te dobiveni kompleks apsorbira plavu svjetlost (λ_{max} = 509 nm) i emitira zeleno svjetlo (λ_{max} = 524 nm). Najčešće se koristi kao DNA boja za prepoznavanje DNA u agaroznim gelovima [11].

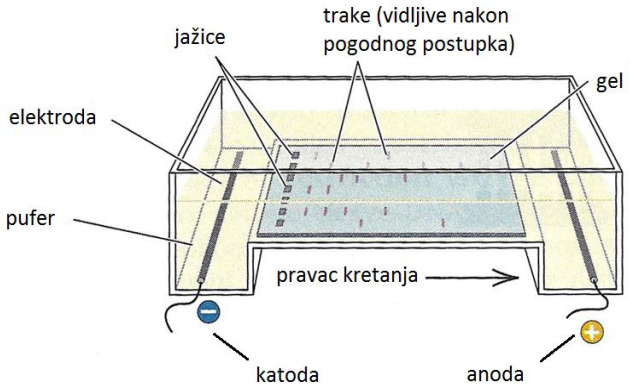
Agaroza (slika 7) je pročišćeni polisaharid dobiven iz agara. Gel od agara se upotrebljava za bolju separaciju proteina od separacije koja je učinjena u slobodnoj otopini. Uz agarozu, agar sadrži i druge komponente, koje sadrže sulfatne i karboksilne skupine, koje u neutralnom i lužnatom mediju disociraju i uzrokuju elektroosmotski tok otapala prema negativnoj elektrodi. Postoji više vrsta agaroze različite čistoće, a one se razlikuju u temperaturi tališta, razini elektroosmoze, čvrstoće i optičke prozirnosti gela [12].



Slika 7. Kemijska struktura jedinica agaroze i struktura polimera u gelu [12]

Agarozni gel nastaje hlađenjem vodene otopine agaroze koja je nastala otapanjem bijelog praha agaroze u kipućoj vodi. Većina agaroznih gelova sadrži između 0,7% i 2% agaroze. Molekule se u gelu umrežavaju i nastaju vlaknaste polimerne strukture tako što pri hlađenju na određenim dijelovima jedinica agaroze nastaju odsječci s dvostrukom uzvojnicom. U porama, između polimernih vlakana, zadržava se otopina elektrolita i nastaje gel. Veličina pora u gelu ovisi o koncentraciji agaroze. Agarozni gel je nezamjenjiv u imunoelektroforezi i separaciji velikih molekula kojima je hidrodinamički radijus veći od 10 nm [12].

Aparatura prikazana na slici br. 8 se sastoji od kalupa za izlijevanje većih i manjih gelova, kade u koju se ulijeva pufer i uranja formirani gel. Kada na sebi ima formirane džepiće za nanošenje uzoraka koji su formirani uz pomoć češljeva različitih debljina i zubaca [13].



Slika 8. Aparatura gel elektroforeze

Preuzeto i prilagođeno iz [14]

2.3.3. DNA sekvenciranje

DNA sekvenciranje je određivanje slijeda nukleotida u bazama adenin, gvanin, citozin i timin u molekuli DNA. Kod DNA i RNA se određuje slijed nukleotida, a kod bjelančevina redoslijed aminokiselina. Uz pravu opremu i materijale, sekvenciranje kratkog dijela DNA je relativno jednostavno. Promjena u DNA sekvenci može dovesti do promijenjenog ili nefunkcionalnog proteina, a time i do genetskog poremećaja. DNA sekvenca je važna za otkrivanje tipa mutacije u genetskim bolestima. Znanje o DNA sekvenciranju je postalo neophodno za temeljna istraživanja proučavanja bioloških

procesa, te na primijenjenim područjima kao što su dijagnostička ili forenzička istraživanja.

Metode sekvenciranja su: Maxam-Gilbert metoda, Sanger-dideoksi metoda, pirosekvenciranje i DNA čipovi. Maxam-Gilbert metoda omogućuje sekvenciranje obilježene sekvence DNA (^{32}P) pomoću nukleotid-specifičnog kemijskog cijepanja. Koriste se kemikalije koje mijenjaju i uklanjaju specifične baze. Svi radioaktivno obilježeni fragmenti se odvajaju na poliakrilamidnom gelu i vizualiziraju autoradiografijom. Sanger-dideoksi metoda je sekvenciranje kontroliranim prekidom sinteze DNA sekvence. Pirosekvenciranje omogućuje sekvenciranje kontroliranom sintezom DNA sekvence. Zadnja metoda je sekvenciranje pomoću DNA čipova, a radi na principu identifikacije nepoznate DNA sekvence na temelju hibridizacije sa poznatim oligonukleotidnim probama [15].

2.4. Cilj istraživanja

Cilj ovog diplomskog rada je ispitati osjetljivost određivanja koncentracije DNA primjenom klasičnog UV/VIS spektrofotometra i Nanofotometra te odrediti koji je uređaj prilagođeniji za koju vrstu uzorka i količinu početnog materijala.

3. MATERIJALI I METODE

3.1. Materijali

3.1.1. Ispitivani materijal

U ovom radu istraživane su dvije vrste uzorka: biljni materijal je svježi bosiljak (lat. *Ocimum basilicum*), a humani uzorak su HeLa stanice uzgojene u staničnoj kulturi u koncentracijama $1,5x10^6$st/mL i $2x10^6$st/mL.

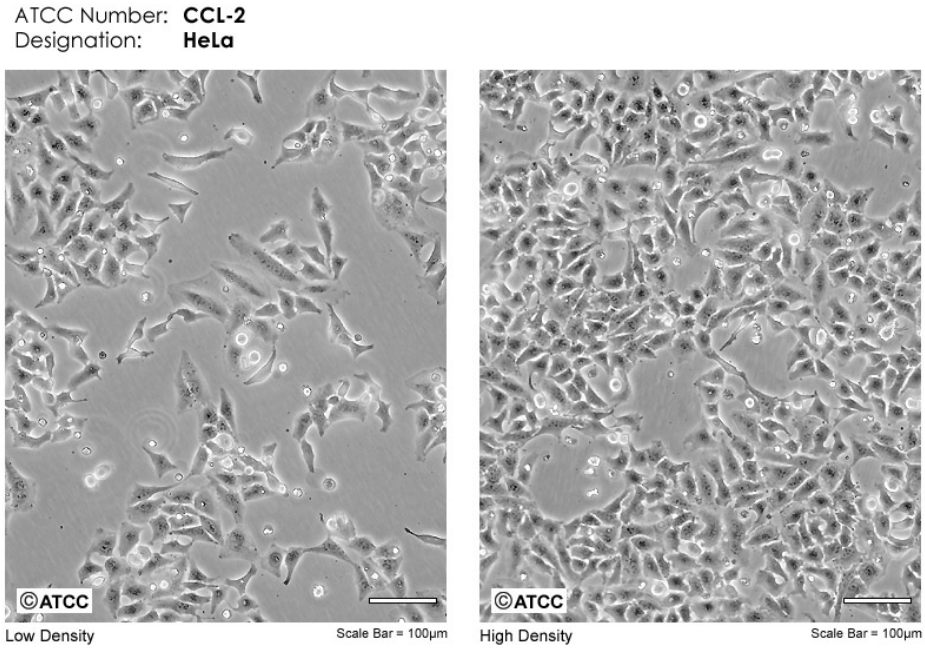
Bosiljak (slika 9) je mirisna biljka, grmastog oblika, a listovi su mu ovalni i zelene boje. Poznat je u kuhinjama talijanske i jugoistočne Azije, ali je sada dostupan širom svijeta. Postoji oko šezdesetak vrsta bosiljka koje su različitog izgleda i okusa. Bosiljak ima snažna antioksidativna, antimutagenska, antitumorska, antivirusna i antibakterijska svojstva koja nastaju iz različitih sastojaka uključujući linalool, 1,8- cineol, estragol i eugenol. Ulje bosiljka posjeduje antibakterijska svojstva te se može koristiti umjesto komercijalnog antibiotika, kao što je amoksicilin, u područjima gdje su oni ograničeni. Antioksidansi štite tijelo od oštećenja uzrokovanih slobodnim radikalima, sprječavaju starenje stanica i nastanak raka dojke, karcinoma debelog crijeva. Također je i dobar izvor vitamina B6 i magnezija, a za ulje bosiljka se pokazalo da povoljno djeluje na imunološki sustav [16].

Sirovi ekstrakt *Ocimum basilicum* uzrokuje pad sistoličkog, dijastoličkog i srednjeg krvnog tlaka sa srednjom efektivnom dozom od 30 mg/kg. Ovaj kardiovaskularni učinak pripisuje se eugenolu koji djeluje blokiranjem kanala kalcija [17].



Slika 9. Bosiljak (lat. *Ocimum basilicum)*

HeLa stanice (slika 10) su ljudske stanice raka vrata maternice i prvi tip ljudske stanice karcinoma koji se kontinuirano uzgaja za eksperimente. Dobile su ime po Henrietti Lacks (slika 11), 31-godišnjoj ženi koja je umrla od raka vrata maternice. Liječnik George Otto Gey je uzgajao HeLa stanice u laboratoriju i distribuirao ih drugim znanstvenicima širom svijeta kako bi ih koristili u svojim eksperimentima. One su prve stanice koje su opstale u uvjetima *in vitro* (u epruveti) te su postale temelj za neka od najznačajnih otkrića u modernoj medicini. Za razliku od normalne populacije ljudskih stanica, koje se dijele 40-50 puta prije smrti, HeLa stanice imaju izvanrednu sposobnost podjele na neodređeno vrijeme. Životni je vijek stanice programiran. Samo su stanice preobražene virusom ili genskom mutacijom imale potencijal postati besmrtne. Na kraju svakog kromosoma postoji nit DNA koji se naziva telomer i koja se malo skrati svaki put kada se stanica podjeli. Kako normalne stanice prolaze svoj životni vijek, njihovi se telomeri skraćuju sa svakom diobom sve dok potpuno ne nestanu. Nakon toga stanica se prestane dijeliti i počne umirati. Ljudske kancerogene stanice sadrže enzim telomerazu koji ponovno izgrađuje njihove telomere tako da stanice mogu beskonačno regenerirati svoje telomere te je time objašnjen mehanizam beskonačnosti HeLa stanica [18].



Slika 10. HeLa stanice [19]

Jonas Salk, virolist Nacionalne zaklade za infantilnu paralizu je razvio cjepivo 1952. godine. Zahvaljujući HeLa stanicama i njihovom brzo rastu, cjepivo je bilo spremno za ljudske bolesnike u roku manjem od godinu dana [18].

Znanstvenici su ih koristili za razvoj staničnog kloniranja, izolacije matičnih stanica te u proučavanju raka, HIV-a, ljudskog genoma, tuberkuloze, HPV-a, Parkinsonove bolesti i u industriji kozmetike [18].



Slika 11.Henrietta Lacks [20]

3.1.2. Kemikalije i reagensi

Kemikalije i reagensi za izolaciju genomske DNA iz stanica u kulturi metodom isoljavanja

- HeLa stanice u koncentraciji $1,5x10^6$st/ml i $2x10^6$ st/ml
- SE pufer (75 mM NaCl, 25 mM EDTA, pH 8,0)
- TE pufer (10 mM Tris-HCl pH 7,4, 1 mM EDTA pH 8,0)
- 20 % SDS (natrijev dodecil sulfat), ACROS organics
- Proteinaza K, Roche, Švicarska
- 5 M otopina natrijeva klorida, Kemika
- Apsolutni etanol, CARLO ERBA, reagents

- Ledeno hladni 70% etanol

Kemikalije i reagensi za izdvajanje genomske DNA iz biljnog tkiva [21]

- Pufer za izdvajanje ukupne DNA iz biljnog tkiva
    - 2 % (m/v) heksadeciltrimetil amonijev bromid, SIGMA-ALDRICH
    - 0,02 M EDTA (etilendiamintetraoctena kiselina) (pH 8,0), VWR, Prolabo, Chemicals
    - 0,1 M Tris-HCl (pH 8,0)
    - 1,4 M natrijev klorid (NaCl), Kemika
    - 1 % (m/v) polivinil-pirolidon (PVP topljivi), SIGMA-ALDRICH
    - Neposredno prije postupka izdvajanja dodati u otopinu 0,008 g/mL 1,4 ditiotreitol, Electran® Molecular biology grade
- Tekući dušik
- Diklormetan, Kemika
- Izopropanol, Gram Mol
- 75 % etanol

Kemikalije i reagensi za elektroforezu DNA u agaroznom gelu u nativnim uvjetima [21]

- TAE pufer (50x):
    - 2 M Tris-acetat
    - 50 mM EDTA (pH 8,0)
- SYBR Safe^{TM} DNA gel stain, Eugene, Oregon, USA
- 1x TAE pufer sa SYBR safe-om
- Agaroza, SIGMA, USA
- DNA Gel Loading Dye (6x), Termo Fisher SCIENTIFIC, USA
- DNA standard: Mass Ruler^{TM} Low Range DNA Ladder, Fermentas, USA
- 0,5 M EDTA (pH 8,0)

3.1.3. Instrumenti i pribor

Instrumenti

- Vodena kupelj- Memmert

- Sustav za vodoravnu elektroforezu u agaroznom gelu (kadica, češljić,)
- Transiluminator i/ili prijenosna UV-svjetiljka (valne duljine 302 nm)
- Polaroid kamera za snimanje gelova
- Centrifuga- Tehnica Centric 200R
- Spektrofotometar- Shimadzu UV-1700, Pharma Spec
- Nanofotometar- model P330, tvrtka IMPLEN
- Izvor struje: CONSORT 80V

Pribor

- Mikropipete
    - 0,5-10 µL (Eppendorf)
    - 10-100 µL (Hirschmann)
    - 0,5-5,0 mL (LLG Micropipette)
- Tarionik i tučak
- Analitička vaga- Kern EW 420-3NM
- Eppendorf epruvete
- Odmjerne tikvice
- Laboratorijske čaše
- Trbušaste pipete
- Graduirane pipete

3.2. Metode

3.2.1. Izolacija genomske DNA iz stanice u kulturi metodom isoljavanja

Izvori koji se koriste za izolaciju DNA uključuju cijelu krv, kosu, spermu, kosti, tkiva, krvne mrlje, sline, epitelne stanice, urin, bakterije, životinjska tkiva ili biljke. Metode izolacije koje se koriste su prilagođene na način da učinkovito pročiste DNA. Bitna je i veličina uzorka te je li uzorak svjež ili pohranjen. Izolacija DNA počinje razgradnjom tkiva ili stanica te je taj proces bitan za uništavanje proteinskih struktura. Liza odnosno razgradnja se provodi u otopini soli, a ona sadrži SDS i proteinazu K [22].

Proteinaza K je enzim koji cijepa peptidnu vezu u proteinima pored karboksilne skupine hidrofobnih aminokiselinskih ostataka. Aktivator proteinaze K je deterdžent, kao

što je SDS, te će ona puno bolje djelovati u njegovoj prisutnosti. Pri povišenim temperaturama također se povećava aktivnost proteinaze K, a optimalna temperatura se kreće između 50-65 °C. Uvjeti kao što su povišena temperatura i deterdženti pomažu u denaturaciji proteina. Tipična koncentracija pri kojoj proteinaza K djeluje je od 50-100 μg/mL [23].

Postupak:

Uzgojene HeLa stanice staviti u epruvete i centrifugirati pri 1100 okretaja/min na temperaturi od 4 ºC tijekom 5 minuta. Nakon centrifugiranja, supernatant ukloniti, a na istaložene stanice se dodati 1,5 mL SE pufera i 75 mL SDS-a. Dodati još i 4 μL proteinaze K te inkubirati par sati na 56 °C. Nakon inkubacije dodati 0,4 mL 5 M otopine NaCl-a i dobro promiješati. Uzorak centrifugirati 15 min na 5000 o/min na sobnoj temperaturu. Dio supernatanta pomiješati s jednakim volumenom apsolutnog etanola (-20 °C). Centrifugirati 10 min na 14 000 o/min pri 4 °C. Odliti supernatant i talog oprati s ledeno hladnim hladnim 70% etanolom. Postupak ispiranja ponoviti dva puta. Istaloženu DNA osušiti na sobnoj temperaturi i otopiti u TE puferu. Na kraju provjeriti kvalitetu izolirane DNA elektroforezom u agaroznom gelu i izmjeriti koncentraciju.

3.2.2. Izolacija genomske DNA iz biljnog tkiva

Postupak:

Usitniti biljni materijal (200 mg) drobljenjem u porculanskom tarioniku s mikropistilom uz zalijevanje tekućim dušikom. Nakon toga dodati 1 mL puferske otopine za izdvajanje DNA i homogenizirati mikropistilom. Uzorak staviti u mikroepruvetu i inkubirati 1 sat pri 55 °C uz povremeno miješanje okretanjem mikroepruvete. Dodati 400 μL diklormetana i lagano promiješati te centrifugirati 10 min pri 12000xg i 4 °C. Supernatant (približno 800 μL) otpipetirati u čistu mikroepruvetu i dodati 600 μL (2/3 volumena) izopropanola, promiješati okretanjem i ostaviti najmanje 1 sat pri -20 °C. Nakon određenog vremena centrifugirati 10 min pri 12000xg i 4 °C, a supernatant pažljivo ukloniti. Oprati talog dodavanjem 1 mL 75% etanola i centrifugiranjem tijekom 10 min pri 12000xg i 4 °C. Na kraju pažljivo odliti etanol, a talog osušiti i otopiti u 100 μL reH_2O.

Provjeriti kvalitetu izolirane DNA elektroforezom u agaroznom gelu i izmjeriti koncentraciju [21].

3.2.3. Agarozna gel elektroforeza

Postupak:

Pripremiti 1% gel dodatkom izvagane agaroze u 1xTAE pufer. Otopina se zatim zagrijavati do vrenja u mikrovalnoj pećnici (otvor tikvice poklopiti Petrijevom zdjelicom kako otopina ne bi isparila). Kada se otopina zagrije, promiješati i provjeriti jesu li se otopili svi kristali agaroze. Ako se kristali nisu otopili, potrebno je postupak zagrijavanja ponoviti sve dok se sav sadržaj ne otopi. Sadržaju dodati SYBER Safe, koji će otopinu obojiti u blago narančastu boju, te ohladiti na približno 40 °C i uliti u kadicu. Na kadicu sa gelom polako staviti češalj za jažice i agarozni gel se tako ostavi polimerizirati 30 min zaštićen aluminijskom folijom od svijetla, jer se učinkovitost gela smanjuje pod njegovim utjecajem (slika 12).



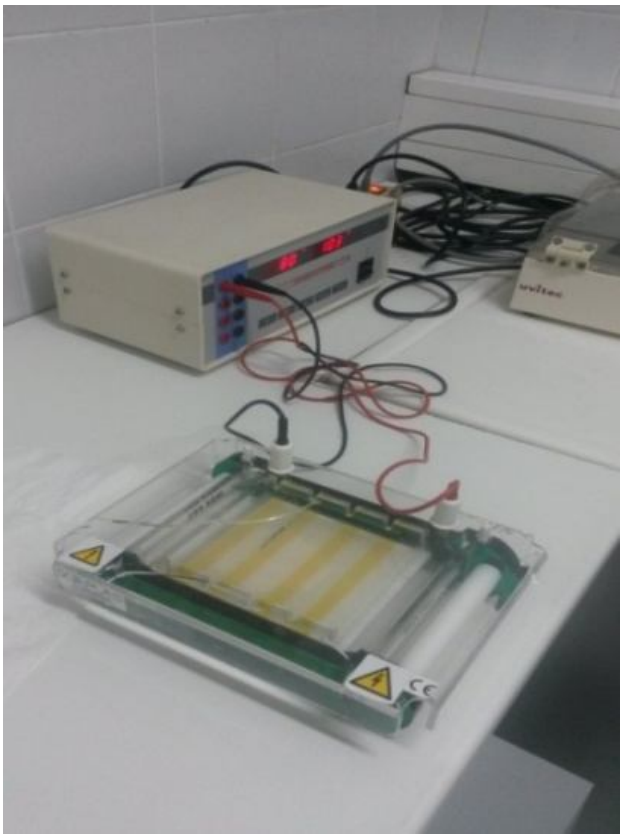
Slika 12. Izrada agaroznog gela

Preuzeto iz [24]

Nakon što se gel polimerizirao, češalj se izvadi te se ukloni zaštita kojom se obložila kadica. Agarozni gel staviti u uređaj za elektroforezu te se uliti 1x TAE pufer da prekrije gel. DNA uzorci se pomiješaju s bojom za nanošenje (DNA loading Dye) na način da se

stavi 1 µL boje i 5 µL uzorka. Marker koji se koristi je Mass Ruler Low Range DNA Lader. Nanijeti 5 µL markera u prvu jažicu, a nakon toga se nanijeti DNA uzorke.

Kada su naneseni svi uzorci, zatvoriti uređaj za elektroforezu i spojiti na protok struje od 80 V u periodu od 30 min sve dok se narančasta boja ne približi suprotnom rubu gela. Jažice sa uzorcima moraju biti na strani anode, kako bi se negativno nabijene molekule kretale prema katodi. Nakon završene elektroforeze, gel fotografirati pomoću uređaja za snimanje agaroznih gelova.



Slika 13. Korištena agarozna gel elektroforeza

3.2.4. Određivanje koncentracije DNA pomoću Nanofotometra

Nanofotometar je sveobuhvatan za različite spektrofotometrijske primjene u modernom laboratoriju. Na temelju raspoloživih metoda za pojedinačne ili višestruke valne duljine i mjerenja koncentracije, određivanja standardnih krivulja kao i izračunima omjera i kinetikom, korisnik može stvoriti sve vrste prilagođenih aplikacija za individualne potrebe.

Nanofotometar klase P330 uključuje integriranu miješalicu kako bi se osigurala dobra homogenost uzorka. Najmanji volumen koji se može koristiti je 0,3 µL [26].

Zadnji korak kod pripreme DNA je razdvajanje od proteina. Za analizu i daljnja istraživanja potrebno je znati njenu čistoću i koncentraciju koje se određuju uz pomoć apsorpcije ultraljubičastog zračenja. Omjer koji se koristi za procjenu čistoće je A260/A280. DNA apsorbira gotovo dvostruko više na 260 nm, nego na 280 nm te bi ciljani omjer trebao biti 1,8. Ako je u uzorku zaostalo proteina onda će se povećati očitanje apsorbancije na 280 nm budući da je to pik za apsorpciju proteina. Proteini će imati jako mali učinak na apsorbanciju na 260 nm tako da će omjer iz tog razloga biti manji od 1,8. Osim valne duljine od 260 nm, proteini apsorbiraju i na 230 nm te se i omjer A260/A230 također može koristiti za određivanje onečišćenje DNA proteinima, ali se ne upotrebljava često jer na 230 nm apsorbira i pufer kao što je Tris [25].

Nanofotometar (slika 14) mjeri na valnim duljinama 260 i 280 nm te određuje apsorpcijski spektar između 220 i 350 nm. Automatski računa koncentracije i prikazuje ih kao ng/µL (1ng/µL= 1µg/ml) [26].

Koncentracija DNA se određuje pomoću jednadžbe:

c_{DNA}= A260 x 50 µg/mL x 50 [27]



Slika 14. Nanofotometar model P330 [26]

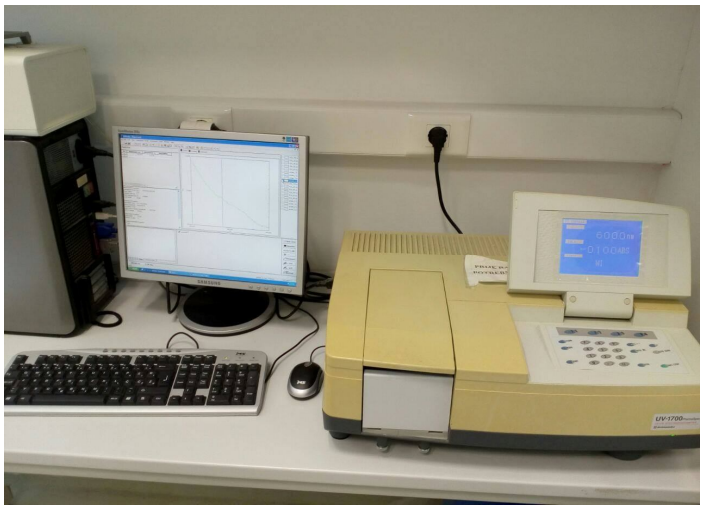
3.2.5. Određivanje koncentracije DNA pomoću UV-VIS spektrofotometra

UV-1700 spektrofotometar prikazan na slici br. 15 je pogodan, jer njegove značajke su točnost, jednostavnost i dugotrajnost. Glavna prednost je razlučivost od 1 nm za spektralnu širinu pojasa, te ta točnost valne duljine rezultira visokom rezolucijom i jasnijem očitanju spektra apsorbancije. Optički spektrofotometar zabilježit će valnu duljinu svjetlosti pri kojoj je došlo do apsorbancije kao i veličinu apsorbancije pri svakoj valnoj duljini. Načelo UV/VIS spektroskopije je da se prolaskom UV/VIS zračenja kroz otopinu uzorka dio apsorbira, a dio prolazi. U kratkom vremenu, spektrofotometar skenira UV/VIS spektar i na detektoru registrira valnu duljinu (nm) pri kojoj nastupa apsorpcija. Dio molekule koja apsorbira zračenje naziva se kromofor [28].

Vidljivo područje spektra obuhvaća fotone energije od 36 do 72 kcal/mol, a blisko UV područje (200-400 nm) fotone energije od 143 kcal/mol.

Koncentracija DNA uz pomoć UV-VIS spektrofotometra se računa, isto kao i kod nanofotometra, preko jednadžbe:

c_{DNA}= A260 x 50 µg/mL x 50 [27]



Slika 15. Korišteni UV-VIS spektrofotometar

4. REZULTATI

4.1. Određivanje koncentracije DNA pomoću Nanofotometra

Izmjerene koncentracije i kvaliteta, odnosno čistoća izolirane DNA pomoću Nanofotometra prikazane su u tablici 1.

Tablica 1. Koncentracija DNA određena mjerenjem na Nanofotometru pri valnoj duljini od 260 nm uz koeficijent razrjeđenja koji iznosi 50

UZORAK	C_{DNA} ng/µL	ČISTOĆA A260/280	ČISTOĆA A260/230
Bosiljak 1	**494**	**2,023**	**1,533**
Bosiljak 2	**439**	**2,025**	**1,606**
HeLa stanice- 1,5x10^{6}st/mL	**538**	**1,944**	**2,235**
HeLa stanice- 2x10^{6}st/mL	**595**	**1,919**	**1,916**

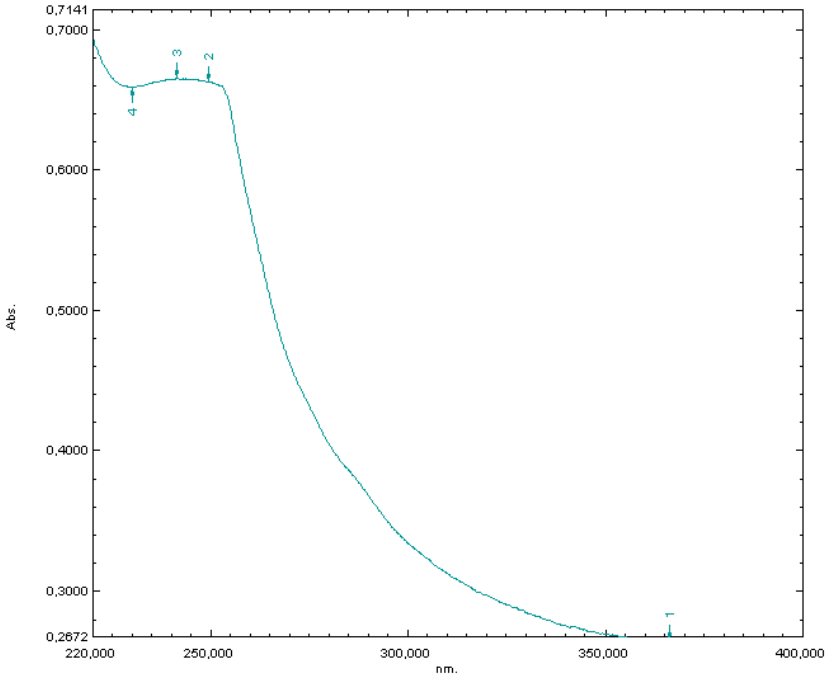
4.2. Određivanje koncentracije DNA pomoću UV-VIS spektrofotometra

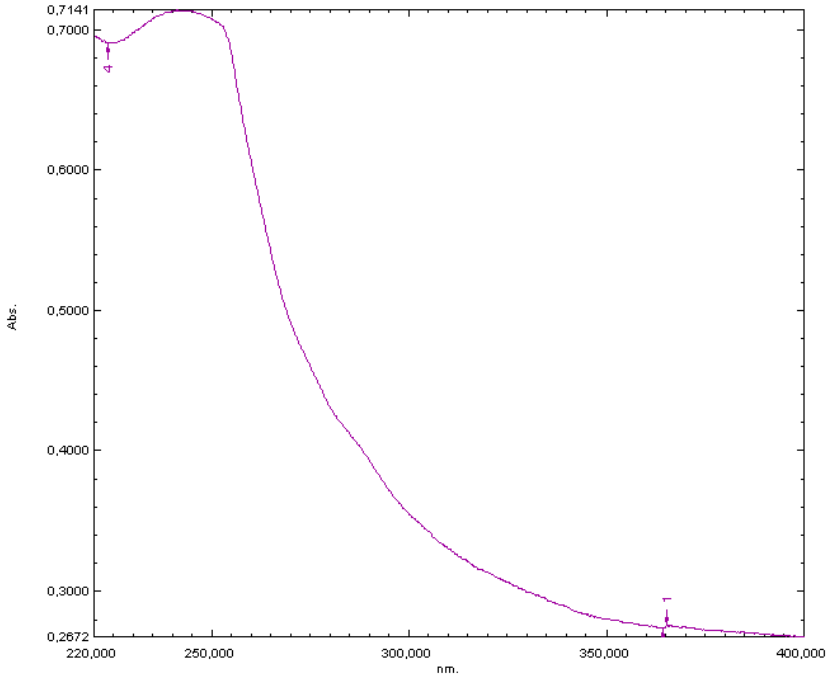
Izmjerene koncentracije i kvaliteta, odnosno čistoća izolirane DNA pomoću UV-VIS spektrofotometra prikazane su u tablici 2.

Tablica 2. Koncentracija DNA određena mjerenjem na UV-VIS spektrofotometru pri valnoj duljini od 260 nm uz koeficijent razrjeđenja koji iznosi 50

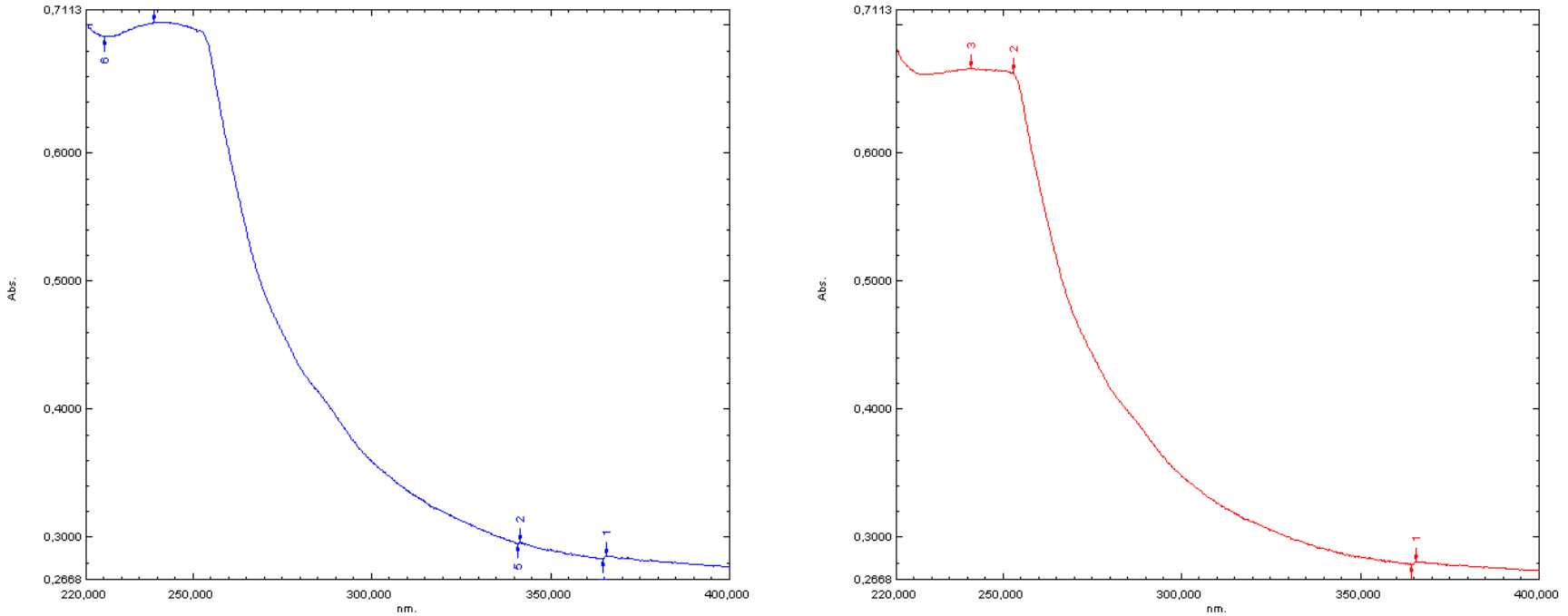
UZORAK	VALNA DULJINA /nm			C_{DNA} ng/µL	ČISTOĆA A260/280	ČISTOĆA A260/230
	230nm	260nm	280nm			
Bosiljak 1	A=0,6587	A=0,5664	A=0,3994	141,6	1,418	0,859
Bosiljak 2	A=0,6976	A=0,6023	A=0,4226	150,58	1,425	0,863
HeLa stanice-1,5x10^6 st/mL	A=0,6936	A=0,5968	A=0,4226	149,2	1,412	0,860
HeLa stanice-2x10^6 st/mL	A=0,6609	A=0,5713	A=0,410	142,83	1,393	0,864

Mjerenje s UV-VIS spektrofotometrom provedeno je na tri valne duljine: 230, 260 i 280 nm. Prikaz ovisnosti apsorbancije o valnoj duljini pri 230 nm za istraživane uzorke prikazan je na slici 16, a prikazi ovisnosti pri ostale dvije valne duljine prikazani su na slikama 17 i 18.


0,7141
0,7000
0,6000
0,5000
0,4000
0,3000
0,2672
Abs.
220,000
250,000
300,000
350,000
400,000
nm.
4
3
2
1

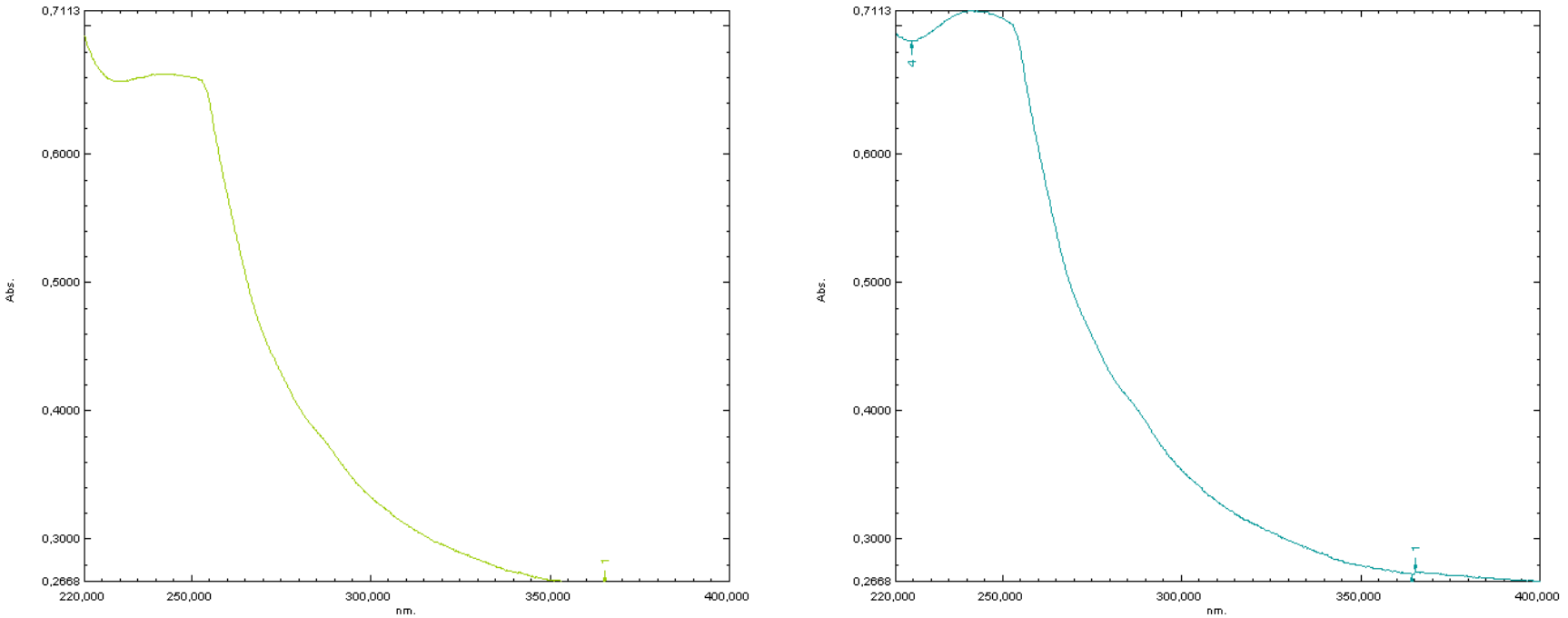

0,7141
0,7000
0,6000
0,5000
0,4000
0,3000
0,2672
Abs.
220,000
250,000
300,000
350,000
400,000
nm.
4
1

(a), (b)

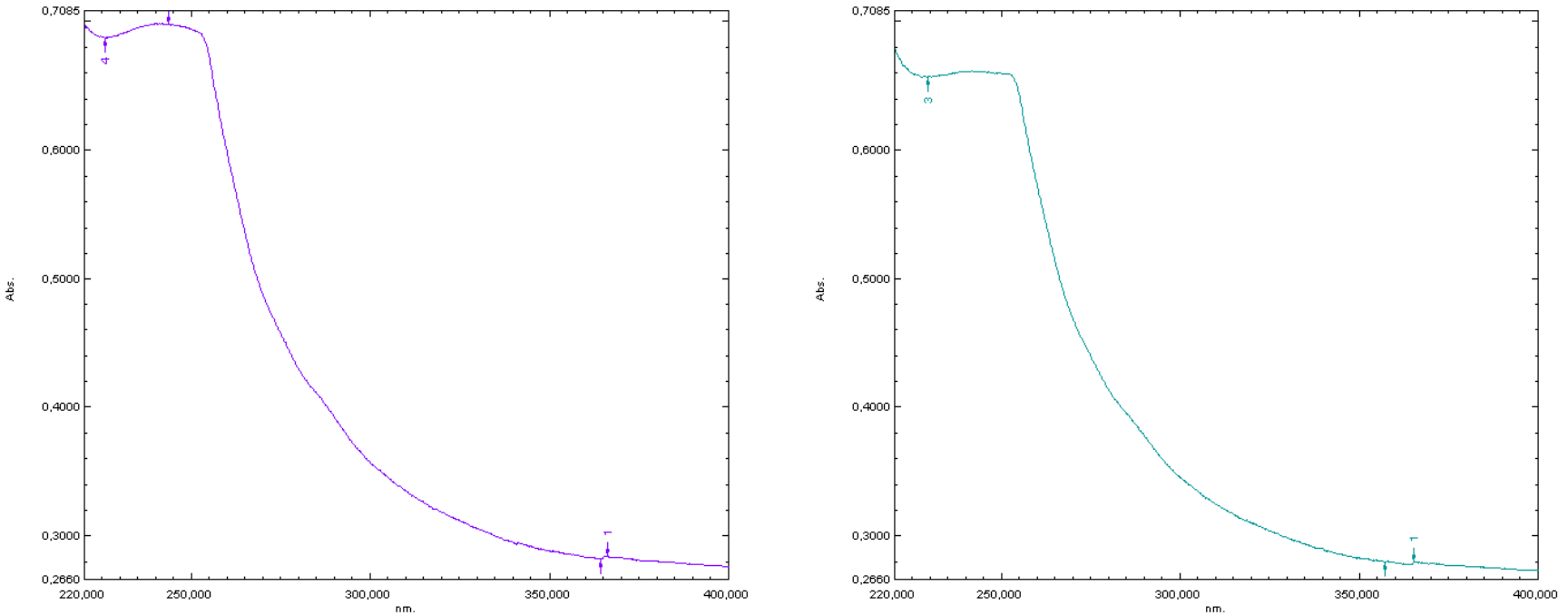


(c), (d)

Slika 16. Prikaz ovisnosti apsorbancije o valnoj duljini pri 230nm za uzorke: (a) 1. uzorak bosiljka, (b) 2. uzorak bosiljka, (c) HeLa stanice koncentracije 1,5 x 10^6 st/mL, (d) HeLa stanice koncentracije 2 x 10^6 st/mL. Mjerenje je izvršeno na mjernom uređaju Shimadzu UV-1700, PharmaSpec

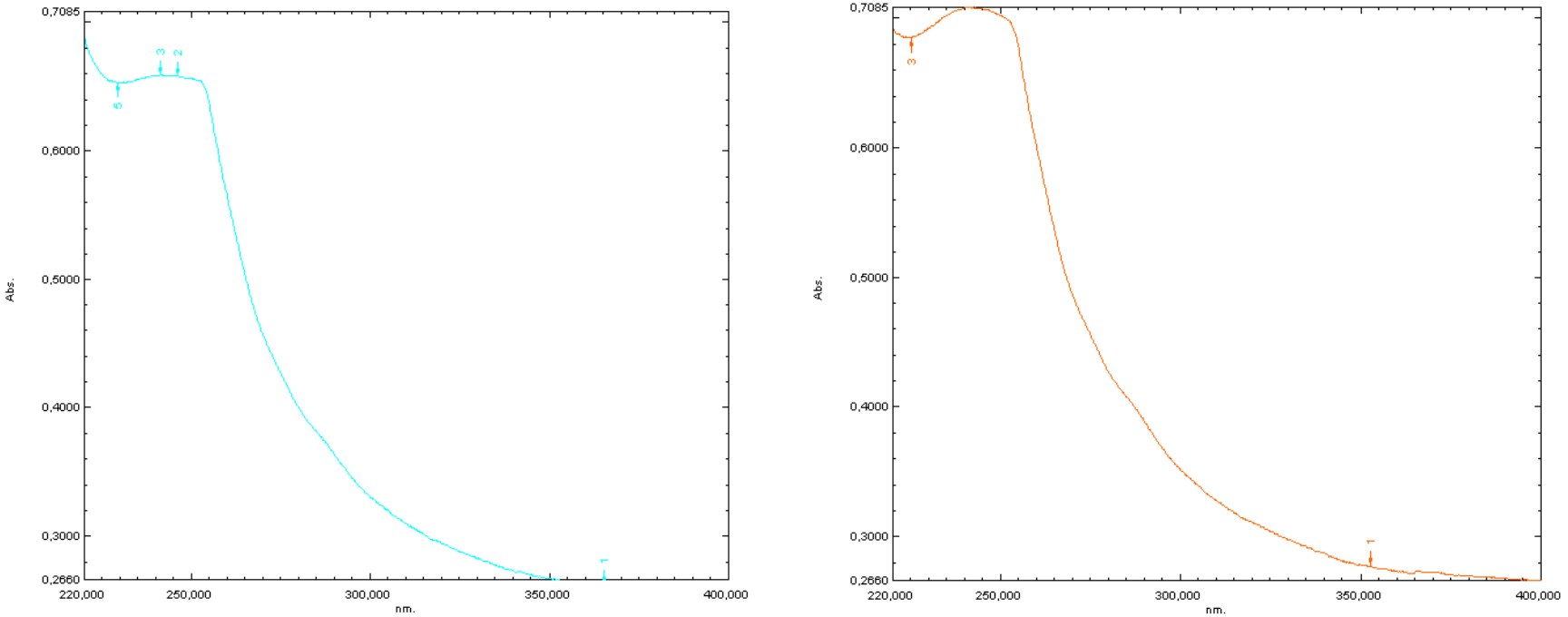

0,7113
0,6000
0,5000
0,4000
0,3000
0,2668
Abs.
220,000
250,000
300,000
350,000
400,000
nm.
0,7113
0,6000
0,5000
0,4000
0,3000
0,2668
Abs.
220,000
250,000
300,000
350,000
400,000
nm.

(a), (b)

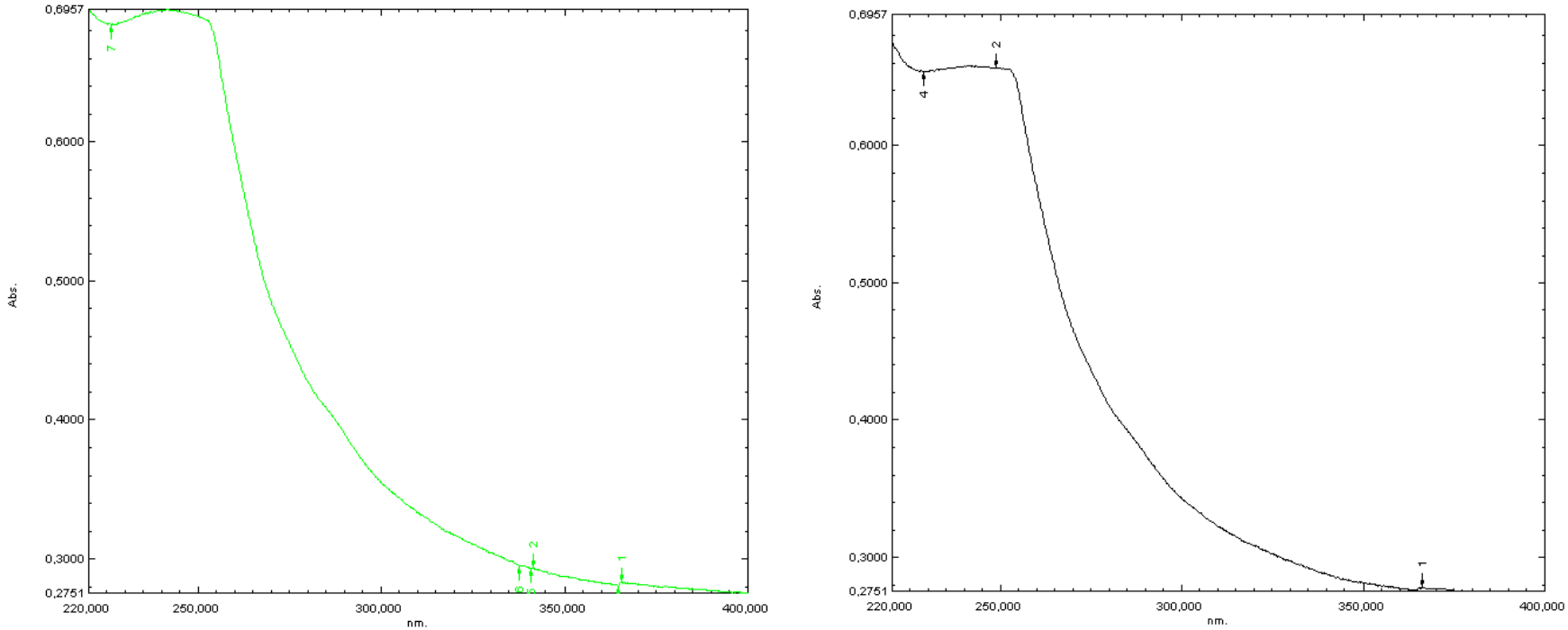


(c), (d)

Slika 17. Prikaz ovisnosti apsorbancije o valnoj duljini pri 260 nm za uzorke: (a) 1. uzorak bosiljka, (b) 2. uzorak bosiljka, (c) HeLa stanice koncentracije 1,5 x 10^6st/mL, (d)HeLa stanice koncentracije 2 x 10^6st/mL. Mjerenje je izvršeno na mjernom uređaju Shimadzu UV-1700, PharmaSpec


0,7085
0,6000
0,5000
0,4000
0,3000
0,2660
Abs.
220,000
250,000
300,000
350,000
400,000
nm.
3
2
1
0,7085
0,6000
0,5000
0,4000
0,3000
0,2660
Abs.
220,000
250,000
300,000
350,000
400,000
nm.
3
1

(a), (b)

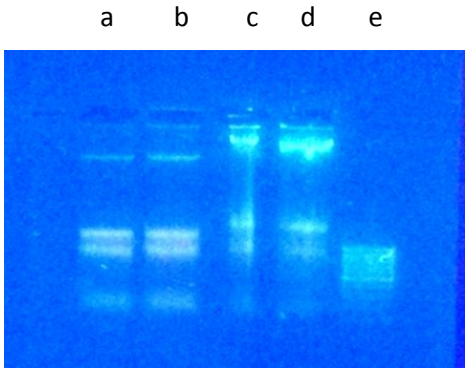


(c), (d)

Slika 18. Prikaz ovisnosti apsorbancije o valnoj duljini pri 280 nm za uzorke: (a) 1. uzorak bosiljka, (b) 2. uzorak bosiljka, (c) HeLa stanice koncentracije 1,5 x 10^6 st/mL, (d) HeLa stanice koncentracije 2 x 10^6 st/mL. Mjerenje je izvršeno na mjernom uređaju Shimadzu UV-1700, PharmaSpec.

4.3. Agarozna gel elektroforeza

Nakon provedene agarozne gel elektroforeze vizualizirana je izolirana DNA (slika 19).



Slika 19. Prikaz vizualizirane izolirane DNA nakon završetka agarozne gel elektroforeze: a) 2. uzorak bosiljka, b) 1. uzorak bosiljka, c) HeLa stanice koncentracije 2 x 10^6 st/mL, d) HeLa stanice koncentracije 1,5 x 10^6st/mL, e) standard za veličinu DNA odsječaka.

5. RASPRAVA

Purinske i pirimidinske baze apsorbiraju svijetlost valne duljine 260 nm pri čemu vrijednost A260=1 (mjereno u kiveti širine 1 cm) odgovara približno koncentraciji dvolančane DNA od 50 g/ml. Kao što je već spomenuto u prijašnjem poglavlju, čistoća DNA se može spektrofotometrijski ispitati mjerenjem A280 i A230 te izračunavanjem omjera A260/A280 i A260/A230. Čista DNA daje omjer A260/A280 između 1,8 i 2,0. Vrijednost omjera A260/A280 manja od 1,8 je pokazatelj prisutnosti proteina u uzorku, dok su vrijednosti veće od 2,0 pokazatelj prisutnosti RNA u uzorku. Veliki omjeri 260/280 većinom pokazuju da je uzorak kontaminiran s zaostalim fenolom ili reagensima koji se koriste u protokolu ekstrakcije [23].

Kontaminacija uzoraka s malim omjerima 260/280 nm može se identificirati ispitivanjem cijelog spektra, npr. pomoću nanofotometra. Visok omjer 260/280 nm ne mora nužno prikazivati neki problem. Vrlo visok omjer može ukazivati na lošu kvalitetu pozadine (*blank-a*) koji eliminira signale blizu 280 nm. Postoje i slučajevi kada su omjeri čistoće unutar granice, ali postoje problemi pri daljnjoj analizi (PCR, sekvenciranje).

Može doći do promjena omjera 260/280 nm između UV-VIS spektrofotometra i Nanofotometra. Promjene koje se mogu dogoditi su promjena u kiselosti uzoraka i točnosti valne duljine [23].

Uzorke DNA je najbolje čuvati smrznute na jako niskim temperaturama, ispod -40 ºC te izbjegavati odmrzavanje i ponovno zamrzavanje. Ukoliko je moguće, koncentraciju DNA i čistoću najbolje je određivati neposredno nakon izolacije.

Za mjerenje koncentracije DNA pomoću Nanofotometra koristio se samo 1 µL uzorka bez razrjeđenja, dok se za mjerenje koncentracije pomoću UV/VIS spektrofotometra koristio razrijeđeni uzorak, odnosno 1 µL uzorka i 49 µL destilirane vode. Prilikom mjerenja DNA se većinom koriste kvarcne kivete, jer propuštaju UV/VIS zračenje, a u ovom radu su se koristile plastične kivete koje nisu baš adekvatne za UV područje.

Čistoća A260/280 koja je dobivena mjerenjem na UV-VIS spektrofotometru iznosi 1,418 i 1,425 za bosiljak, dok čistoća koja je dobivena mjerenjem na Nanofotometru iznosi 2,023 i 2,025. Omjer „čiste DNA“ je između 1,8 i 2,0 što pokazuje da su bolji rezultati dobiveni mjerenjem s Nanofotometrom. Što se tiče uzorka HeLa stanica također su bolje čistoće A260/280 dobivene mjerenjem na Nanofotometru, a iznose 1,944 i 1,919.

Čistoća A260/230 se koristi kao druga mjera čistoće DNA. Što je manji omjer, to je veća onečišćenost uzorka. Omjer A260/230 trebao bi biti veći od 1,5, idealno bi bilo blizu 1,8. Čistoća A260/230 dobivena mjerenjem pomoću UV-VIS spektrofotometra je 0,859 i 0,863 za bosiljak te 0,860 i 0,864 za HeLa stanice, što pokazuje da je uzorak dosta onečišćen. Nanofotometar i u ovom slučaju pokazuje bolje rezultate budući da su omjeri za bosiljak 1,533 i 1,606, a za HeLa stanice 2,235 i 1,916.

Agarozna gel elektroforeza izolirane DNA nadopunjuje podatke koji su dobiveni određivanjem koncentracije DNA. Standardi, koji se koriste za kvantitativno označavanje, trebaju biti obilježeni na isti način kao i DNA uzorci koji se analiziraju. Kako bi se vizualizirala DNA, potrebna su bojenja s interkalatorskom bojom kao što je SYBR safe. Po dobivenoj vizualiziranoj DNA mogu se vidjeti nečistoće, odnosno RNA koja je prisutna u uzorku.

Po rezultatima se može primijetiti da je čistoća DNA puno bolja mjerenjem pomoću Nanofotometra, a jedan od razloga je mala količina nerazrijeđenog uzorka koji se koristio. Izračunavanjem koncentracije pomoću izmjerenih podataka vidljiva je dosta manja koncentracija DNA kod mjerenja pomoću UV/VIS spektrofotometra, što također pokazuje jedan od nedostataka ove metode. Mjerenja na Nanofotometru su se radila samo jednom, dok se na UV/VIS spektrofotometru ponovilo dva puta jer su rezultati bili dosta drugačiji od rezultata na Nanofotometru.

6. ZAKLJUČAK

- Na temelju rezultata može se zaključiti da je Nanofotometar prikladniji uređaj za određivanje koncentracije DNA. Razlozi koji to pokazuju su bolja čistoća DNA i veća koncentracija DNA.
- Neodgovarajući uvjeti skladištenja utječu na točnost i kvalitetu rezultata pri mjerenju koncentracije DNA.
- Plastične kivete nisu adekvatne za mjerenje u UV području.
- Bolje rezultate pokazuje uzorak HeLa stanica od uzorka bosiljka, jer je DNA iz biljke dosta teško izolirati i postupak je duži. Razlog koji otežava izolaciju su sekundarni spojevi koje daju biljne vrste prilikom izolacije. Bosiljak producira različite niskomolekularne fenilpropanoide koji mogu ometati izoliranu DNA.
- Agarozna elektroforeza je potvrdila nedovoljnu čistoću uzorka što je posljedica primjene metode isoljavanja u postupku izolacije.
- U metodičkom dijelu opisana je tema „Nukleinske kiseline“ za srednju školu, a sadrži pisanu pripremu za nastavni sat, radni listić, te jedan pokus. Nakon što učenici samostalnim izvođenjem predviđenog pokusa u 3 skupine dođu do određenih zaključaka, predviđeno je frontalno predavanje kao zaključak na izvedene pokuse. Pokus „Izolacija genomske DNA iz biljnog materijala metodom „uradi sam“ potiče uključivanje učenika u izvedbu sata i zanimanje za gradivo te se razvija sposobnost samostalnog zaključivanja.

7. METODIČKI DIO

7.1. Uvod

Cilj metodičkog dijela ovog diplomskog rada je upoznavanje učenika s pojmom nukleinske kiseline, odnosno deoksiribonukleinska kiselina (DNA) i ribonukleinska kiselina (RNA), njihovom strukturom te je poveznica s biologijom. Nastavna jedinica je prikazana na srednjoškolskoj razini.

Rad u skupini je dobar način da učenici sami istražuju odgovore na postavljena pitanja, međusobno surađuju s ostalima u skupini, razvijaju radne sposobnosti i individualizirani rad u skupini. Bitno je da se rad u skupini kombinira s frontalnim radom kako bi se učenicima lakše objasnile neke stvari i usmjerilo ih na prave odgovore. Cilj je navesti učenike da izvedu zaključke vezane uz nastavnu jedinicu. Frontalni rad osigurava istodobno motrenje, prenošenje poruka, sustavno ponavljanje, utvrđivanje znanja i razvitak njihovih sposobnosti. U frontalnom radu je poželjno korištenje filmova, video isječaka i dosta slikovitih prikaza.

Nastavnu jedinicu „Nukleinske kiseline“ lako se može povezati sa svakodnevnim životom i zbog toga se na zanimljiv način treba prikazati učenicima, kako bi shvatili i zapamtili najbitnije činjenice.

Za izvođenje nastave potrebna je učionica opremljena osnovnim laboratorijskim priborom i kemikalijama. Nastavna jedinica se može povezati s gradivom biologije.

7.2. Priprema za nastavni sat

<table>
<tr><td colspan="2">Srednja škola:</td><td colspan="4">Nastavnica:</td></tr>
<tr><td colspan="2"></td><td colspan="4">Marija Štajnbrikner</td></tr>
<tr><td>Predmet:</td><td>Kemija</td><td>Razred:</td><td>4</td><td>Broj sata:</td><td></td></tr>
<tr><td colspan="2">Nastavna cjelina:</td><td colspan="4">Nastavna jedinica: Nukleinske kiseline</td></tr>
<tr><td colspan="2">Ključni pojmovi:
● nukleinske kiseline, DNA, RNA, građevni elementi, primarna struktura nukleinskih kiselina, nukleotid, nukleozid, purin i pirimidin</td><td colspan="4">Korelacija:
● biologija</td></tr>
<tr><td colspan="2">Obrazovna postignuća:
• Definirati pojmove DNA i RNA
• Usvojiti osnovne pojmove purin i purinske baze, pirimidin i pirimidinske baze
• Razlikovati pojmove nukleozid i nukleotid
• Navesti građevne elemente nukleinskih kiselina
Ishodi:
Učenici će moći:
• Objasniti koja ja razlika između purinskih i pirimidinskih baza
• Navesti koji su građevni elementi DNA i RNA</td><td colspan="4">Pitanja za provjeru ostvarenosti obrazovnih ishoda:
• Što je DNA, a što RNA?
• Koja je razlika u građi deoksiribonukleinske kiseline i ribonukleinske kiseline?
• Navesti purinske i pirimidinske baze.
• Što je nukleotid, a što nukleozid?
• Koji su postupci izolacije DNA?</td></tr>
</table>

• Objasniti važnost nukleinskih kiselina • Na temelju pokusa navesti postupke izolacije DNA	
Tip sata:	obrada novog gradiva
Cilj sata:	Usvojiti pojmove nukleinske kiseline, DNA, RNA, građevni elementi, primarna struktura nukleinskih kiselina, nukleotid, nukleozid, purin i pirimidin

Tijek nastavnog sata

Aktivnosti učitelja/učiteljice	**Aktivnosti učenika/učenica**	**Nastavna sredstva i pomagala**	**Metode i oblici rada**
1. Uvodni dio sata (5 min) • prije početka samog sata spremiti sve za izvođenje pokusa • pozdravljanje razreda • nabrajanje asocijacija vezanih uz nastavnu jedinicu	• Učenici se javljaju i odgovaraju na pitanja nakon što su prozvani.	• ploča • PPT prezentacija	• razgovor, • frontalni rad, • individualni rad
2. Obrada novog gradiva (35 min)			

Aktivnosti učitelja/učiteljice	Aktivnosti učenika/učenica	Nastavna sredstva i pomagala	Metode i oblici rada
• Definirati pojmove DNA i RNA • Usvojiti osnovne pojmove purin i purinske baze, pirimidin i pirimidinske baze • Razlikovati pojmove nukleozid i nukleotid • Navesti građevne elemente nukleinskih kiselina	• Zapisuju plan ploče u bilježnice.	• Ploča • Udžbenik • PPT prezentacija	• individualni rad • razgovor • frontalni rad
• učenike podijeliti u 3 skupine i dati im radne listiće prema kojima će izvesti pokus: Izolacija genomske DNA iz biljnog materijala metodom „uradi sam“	• Objašnjavaju promjene nastale u pokusu. • Zapisuju opažanja u radni listić.	• Radni listić	• rad u skupinama • razgovor
3. Završni dio sata (5 min) • ponavljanje naučenog gradiva	• Pismeno odgovaraju na pitanja. Čitaju rješenja zadataka.	• Radni listić	• individualni rad

Zadaci za učenike:	Domaća zadaća Radna bilježnica
Materijali za pripremu nastavnika:	Udžbenici propisani od strane MZOS-a, priručnik za nastavnike

Bilješke o nastavnom satu:

_____

Plan ploče:

Nukleinske kiseline

DNA (deoksiribonukleinska kiselina)

- dvolančana molekula
- nukleotidi (deoksiriboza + dušična baza) povezani fosfodiesterskom vezom
- dušične baze: adenin, gvanin, citozin i timin

RNA (ribonukleinska kiselina)

- jednolančana molekula
- nukleotidi (riboza + dušična baza) povezani fosfodiesterskom vezom
- dušične baze: adenin, gvanin, citozin i uracil

Purini: adenin (A) i gvanin (G)

Pirimidini: citozin (C), timin (T) i uracil (U)

POKUS: Izolacija genomske DNA iz biljnog materijala metodom „uradi sam“

7.3. Pokus: Izolacija genomske DNA iz biljnog materijala metodom „uradi sam“

Postupak izolacije vrlo čiste DNA zahtjeva relativno složenu proceduru. Ona gotovo uvijek uključuje upotrebu specijalnih deterdženata, lužina, organskih otapala i/ili enzima. Međutim, DNA se može izolirati (i vidjeti prostim okom) prilično jednostavnim postupkom koji, u smislu materijala, ne zahtjeva ništa više od onog što možete naći u vlastitoj kuhinji.

Ukratko, postupak izolacije DNA se sastoji od tri osnovna koraka:

Prvi korak je mehaničko usitnjavanje tkiva i otvaranje stanica (ovaj korak se napravi u kuhinjskom mikseru-rezaču).

Nakon toga se tako dobivenom homogenatu tkiva dodaje tzv. ekstrakcijska otopina koja sadrži deterdžent za pranje posuđa i kuhinjsku sol. Deterdžent otapa masti pa će otopiti i stanične membrane (membrane su po svojoj građi fosfolipidni dvosloji) te će to pospješiti oslobađanje staničnog sadržaja, a time i molekula DNA u otopinu. Sol će olakšati kasniji korak taloženja DNA etanolom tako što će Na^+ ioni neutralizirati negativan naboj fosfata na molekulama DNA.

Jedna od kritičnih točaka u dobivanju što čišće DNA je njeno odvajanje od proteina s kojima je u kompleksu. To se u laboratorijskoj praksi postiže upotrebom organskih otapala fenola i kloroforma ili dodatkom nekih pročišćenih proteolitičkih enzima koji cijepaju peptidne veze između aminokiselina nekog proteina. U ovom slučaju, lakše odvajanje DNA od proteina improvizirati će se sokom od ananasa (sok sadrži proteolitički enzim bromelin).

Pribor i kemikalije

- Malo graška i jedna banana
- 0,9 % otopina NaCl
- Šampon
- Sok od ananasa
- 95 % etanol
- Kuhinjski rezač
- Staklena posuda
- Epruveta
- Stakleni štapić
- Žlica

Postupak:

1. Grašak i bananu narezati na komade i miksati 10 sekundi. (Miksanjem se razbija stanična membrana).
2. Smjesu procijediti, preko cjedila miješajući batićem, u staklenu posudu.
3. Procijeđenoj masi dodati fiziološke otopine u istoj količini koliko je i tkiva, te pažljivo promiješati. Fiziološka otopina je 0,9% otopina NaCl! Sol iz fiziološke otopine uzrokuje precipitaciju (taloženje) proteina i ugljikohidrata, dok DNA ostaje u otopini!
4. Dodati jednu žlicu šampona, lagano promiješati da se ne zapjeni. (Šampon potpuno uništava (otapa) staničnu membranu i jezgrinu ovojnicu, slobodna DNA ulazi u sastav otopine!)
5. Mješavinu uliti u epruvetu, dodati 5 ml soka od ananasa, te dodati istu količinu hladnog 95% etanola. Alkohol pažljivo ulijevati uz stjenku epruvete da dođe do odvajanja slojeva (alkohol ostaje iznad taloga). Slojeve ne miješati!
6. Epruvetu staviti u led, pričekati 10-ak minuta kada će početi odvajanje niti DNA sa mjehurićima na površinu sadržaja epruvete!

   Važno je da su svi sastojci i posude hladni, jer niska temperatura štiti DNA od djelovanja enzima koji su prisutni u citoplazmi stanica!

7. Izoliranu DNA možemo izvaditi staklenim štapićem, u istraživačkoj praksi spremna je za daljnja ispitivanja.

Opažanja:

_____

_____

_____

_____

Obrazloženje:

_____

_____

_____

_____

7.4. Primjer radnog listića – Nukleinske kiseline

1. Opiši građu molekule DNA.

2. Objasni razliku između DNA i RNA.

3. Koje su purinske, a koje pirimidinske baze?

4. Navedite tri koraka izolacije DNA koji se koriste u pokusu.

7.5. Primjer radnog listića – Nukleinske kiseline - rješenja

1. Opiši građu molekule DNA.

DNA je građena od serija malih molekula koje se nazivaju nukelotidi. Svaki nukeotid je građen od tri primarne komponente: dušične baze, šećera deoksiriboze i fosfatne grupe vezane na molekulu šećera. Nukleotid je zapravo nukleozid povezan esterskom vezom s jednom ili više fosfatnih skupina. Nukleozidne jedinice u DNA su deokisadenozin, deoksigvanozin, deoksicitidin i timidin, a definiraju se kao jedinice koje se sastoje od baze vezane na šećer.

2. Objasni razliku između DNA i RNA.

I DNA i RNA su dugačke lančaste molekule. DNA su dvolančane molekule (spajaju se komplementarne dušične baze dvostrukim i trostrukim vezama), a RNA su jednolančane molekule. Obje vrste molekula su sastavljene od većeg broja nukleotida (pentoza + dušična baza) povezanih fosfodiesterskom vezom. Kod DNA pentoza je deoksiriboza, a kod RNA riboza. DNA sadrži četiri dušične baze, a to su adenin (A), gvanin (G), citozin (C) i timin (T), dok su kod RNA tri dušične baze iste, a timin (T) je zamijenjen uracilom (U).

3. Koje su purinske, a koje pirimidinske baze?

Purinske baze su adenin (A) i gvanin (G), a pirimidinske baze citozin (C) i timin (T).

4. Navedite tri koraka izolacije DNA koji se koriste u pokusu.

Prvi korak je mehaničko usitnjavanje tkiva i otvaranje stanica. Nakon toga se homogenatu tkiva dodaje ekstrakcijska otopina koja sadrži deterdžent za pranje posuđa i kuhinjsku sol. Zadnji korak je odvajanje DNA od proteina s kojima je u kompleksu.

KRATICE

ATMAB – alkiltrimetilamonijev klorid

BP (engl. *Blood pressure*) – krvni tlak

DNA (engl. *DeoxyriboNucleicAcid*) – deoksiribonukleinska kiselina

EDTA – etilendiamintetraoctena kiselina

HIV – virus humane imunodeficijencije

HPV (engl. *Human papilloma viruses*) – humani papiloma virus

PCR (engl. *Polimerase chain reaction*) – polimerazna lančana reakcija

PVP – polivinil-pirolidon

RNA (engl. *RiboNucleicAcid*) – ribonukleinska kiselina

SDS (engl. *sodiumdodecyl sulfate*) – natrijev dodecil sulfat

LITERATURA

1. L.A.Pray, *Discovery of DNA function and structure: Watson and Crick*, Nature Education, 2008.
2. http://images.sciencesource.com/p/15621734/Watson-and-Crick-BZ9955.html (15.06.2017.)
3. R. R. Sinden, *DNA structure and function*, Albert B. Alkek Institute of Bioscienses and Technology, Center for Genome Research, Department of Biochemistry and Biophysics, Texas A&M University, Houston, Texas, 1994.
4. D. L. Nelson, and M. M. Cox*, Lehninger Principles of Biochemistry* (4th Ed.), W.H. Freeman and Company, New York, 2005.
5. L. Stryer, J. Berg, J. Tymoczko, *Biokemija*, Školska knjiga, 2013.
6. https://www.britannica.com/event/Human-Genome-Project (15.06.2017.)
7. J. M. S. Bartlett, D. Stirling, "*A Short History of the Polymerase Chain Reaction", PCR Protocols*, Methods in Molecular Biology, (2nd ed.), 2003.
8. L. Garibyan, N. Avashia, *"Polymerase Chain Reaction"*, Journal of Investigative Dermatology, 2013.
9. https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/9/96/Polymerase_chain_reaction.svg (06.09.2017.)
10. https://www.thermofisher.com/hr/en/home/life-science/dna-rna-purification-analysis/nucleic-acid-gel-electrophoresis/dna-stains/etbr.html(05.09.2017.)
11. https://www.thermofisher.com/hr/en/home/life-science/dna-rna-purification-analysis/nucleic-acid-gel-electrophoresis/dna-stains/sybr-safe.html (05.09.2017.)
12. I. Piljac, *Elektroforeza*, Media print, Tiskara Hrastić, Zagreb 2006.
13. D. Voytas, *Current Protocols in Molecular Biology*, 2.5A.1-2.5A.9 Copyright by John Wiley&Sons, Inc., 2000.
14. *http://www.discoveryandinnovation.com/BIOL202/notes/images/gelbox.jpg* (23.06.2017.)
15. A.Munshi, DNA sequencing – Methods and Applications, Copyright Intechopen.com, 2012.
16. I. F. F. Benzie and S. Wachtel-Galor, *Herbal Medicine, Bimolecular and Clinical aspects*, 2nd edition, CRC Press/Taylor & Francis, 2011.

17. N. Tabassumand, F. Ahmad, *Role of natural herbs in the treatment of hypertension*, Pharmacognosy Review, 2011.
18. http://berkeleysciencereview.com/article/good-bad-hela/ (22.06.2017.)
19. https://www.lgcstandards-atcc.org/?geo_country=hr (05.09.2017.)
20. https://en.wikipedia.org/wiki/File:Henrietta_Lacks_(1920-1951).jpg
21. Grupa autora, *Metode u molekularnoj biologiji*, Institut Ruđer Bošković, 2007.
22. http://www.encyclopedia.com/science-and-technology/biology-and-genetics/genetics-and-genetic-engineering/dna-isolation-methods (29.06.2017.)
23. S. J. Charette, P. Cosson, *Quick preparation of genomic DNA for PCR analysis*, BioTechniques, 2004.
24. L. Dončević, *Primjena elektroforetskih tehnika u analizi nukleinskih kiselina,* završni rad, 2017.
25. https://www.qiagen.com/us/resources/molecular-biology-methods/dna/ (07.06.2017.)
26. NanoPhotometer P-Class, User Manual P 300/ P330/ P 360, IMPLEN, 2001.
27. https://worldwide.promega.com/resources/pubhub/enotes/how-do-i-determine-the-concentration-yield-and-purity-of-a-dna-sample/ (12.06.2017.)
28. W. W. Wilfinger, K. Mackey, P. Chomczynski, Effect of pH and Ionic Strength on the Spectrophotometric Assessment of Nucleic Acid Purity: *BioTechniques,* 22 (1997), 474-481.

ŽIVOTOPIS

OSOBNE INFORMACIJE

Ime i prezime: Marija Štajnbrikner

Adresa: Školska 28, Satnica, Hrvatska

e-mail: marija.stajnbrikner@gmail.com

Datum rođenja: 07.09.1993.

RADNO ISKUSTVO

24.05.2017. –	studentski posao u trgovini Plodine, Valpovo
26.11.2015. – 01.06.2016.	održavanje individualnih poduka učenicima s teškoćama u učenju u sklopu programa "Dokkica - moja podrška", Osijek

OBRAZOVANJE I OSPOSOBLJAVANJE

2015. –	diplomski studij kemije na Odjelu za kemiju, Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku
2012. – 2015.	Preddiplomski studij kemije na Odjelu za kemiju, Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku
2008. – 2012.	Opća gimnazija, Valpovo

OSOBNE VJEŠTINE

Strani jezici: engleski (dobro poznavanje) i njemački jezik (osnovno)

Digitalna kompetencija: odlično poznavanje rada u MS Office-u

Vozačka dozvola: B kategorija

DODATNE INFORMACIJE

2014. sajam inovacija, Gradski vrt, Osijek

- predstavljanje Odjela za kemiju